

平成 17 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

Ⅱ．主任研究者の報告書

6．幼児の水溶性ビタミンの尿中排泄量－成人からの外挿値の妥当性の検討－

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

水溶性ビタミンの 1 歳以上の食事摂取基準は，成人の推定平均必要量（EAR）からの外挿で算出されている．この外挿方法は，〔求めたい年齢階級の EAR＝EAR の参照値 ×（求めたい年齢階級の基準体重／EAR の参照値の基準体重）^{0.75} ×（1＋成長因子）〕である．この外挿方法が妥当かどうかの検証のひとつとして 3～5 歳の幼児の 24 時間尿中の水溶性ビタミンの排泄量を測定し，その値を体表面積当たりで計算し，既報の成人の相当値と比較した．例数が少ないので，確定的な判断はできないが，今回の件かから判断する限り，ビタミン B₂，ナイアシン，ビタミン B₁₂，ビオチンは外挿方法が妥当と判断された．一方，ビタミン B₁，B₆，パントテン酸，葉酸およびビタミン C は妥当ではないと判断された．今後，さらに例数を増やし，検討を加える．

A. 目的

成人の食事摂取基準¹⁾の外挿により算出している年齢層のうち、3~5歳の幼児の24時間尿の採取を行い、尿中の水溶性ビタミン排泄量を測定し、その値と既報の成人の相当値²⁾とを体表面積あたりで求めた値と比較することにより、体表面積比で算出する食事摂取基準の外挿方法が妥当か否かの検証を行なった。

B. 実験方法

1. 被験者

3~5歳の幼児を持つ地域活動栄養士協議会の会員である母親に調査の目的を説明し、協力の了解を得られた8名（男6名、女2名）で尿サンプル数は全部で37例であった。調査当日は、3~5歳児の食事摂取基準どおりの食事をしてもらうようお願いした。

尿採取時点で4.7歳、身長は102.4±5.4 cm（平均±SD）、体重は16.3±1.8 kgであった。どの被験者も身長体重ともに成長曲線の+2SDと-2SDの間にあり、皆が順調に身体的に発育していた。

2. 尿採取

尿は、調査日の起床すぐの尿は捨て、第2回目の尿から次の日の起床後すぐの第1回目の尿までを遮光のボトルに集め、保冷剤入りの氷詰めクーラーボックスに回収するまで保管した。

回収後、尿量を測定したのちにビタミンごとに前処理を行い、分注し、分析まで-20℃で冷凍保存した。

3. 分析

尿中のチアミン量は、木村らの方法³⁾で測定した。

尿中リボフラビン量は、リボフラビン自体の発する蛍光を蛍光検出器付きのHPLCで測定した⁴⁾。

ニコチンアミドの異化代謝産物である尿中N¹-メチルニコチンアミド(MNA)は、アセトフェノンと縮合させることにより蛍光物質に変え、HPLC法⁵⁾で測定した。また、ニコチンアミドの別の異化代謝産物の尿中N¹-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド(2-Py)、N¹-メチル-4-ピリドン-3-カルボキサミド(4-Py)は、アルカリ性ジエチルエーテルで抽出し、乾固させた抽出物を水に溶解し、その液をHPLCで測定した⁶⁾。

ビタミンB₆の異化代謝産物である尿中4-ピリドキシン酸(4-PIC)は、4-PIC自体が発する蛍光を蛍光検出器付きのHPLCで測定した⁷⁾。

尿中ビタミンB₁₂は*Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* (*L. leichimannii*) ATCC 7830を用いた微生物学的定量法にて測定した⁸⁾。

尿中のパントテン酸は乳酸菌*Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)を用いた微生物学的定量法にて測定した⁹⁾。

尿中の葉酸は乳酸菌*Lactobacillus casei* ATCC 2773を用いた微生物定量法を用いて測定した¹⁰⁾。

尿中のビオチンはビオチン要求株である乳酸菌(*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014)を用いた微生物学的定量法¹¹⁾に従って測定した。

尿中アスコルビン酸は、メタりん酸酸性下で保存した尿をHPLCで測定した¹²⁾。

4. 統計処理

統計学的解析は統計ソフト Stat View 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA))を用いた。ビタミンごとにOne-factor factorial ANOVAで有意差があったものについてはGames-Howell法により多重比較検定を行なった。

C. 結果と考察

表1に各水溶性ビタミンの尿中への排泄量の平均値±SD、最低値、最高値、中央値を示した。回収できた37例のうち取りこぼしのあ

ったものなどを除く、28 例について男女一緒に解析を行った。図 1 には、尿中排泄量（1 日尿当たりの値）の分布図を示した。ビタミン B1 の最低値が 67 nmol/day、最高値が 1065 nmol/day と非常に幅が広く、ビタミン B2 も 61 nmol/day と 956 nmol/day と幅が広がった。ビタミン B12（10→180 pmol/day）、ビタミン C（11→820 μmol/day）も幅が広がった。

既報の成人男、成人女の尿中排泄量²⁾と今回の幼児の尿中排泄量（1 日尿当たりの値）の 3 つを図 2 に示した。また、図 3 には成人男、成人女、幼児 1 日あたりの尿中排泄量を、それぞれビタミンごとに体表面積当たりで計算して表した。

体表面積当たりでの算出方法は、各個人別に 1 日あたりの尿中排泄量を、デュボア式を用いて計算した体表面積で割った。

デュボア式体表面積算出式は

$$\text{体重(kg)}^{0.425} \times \text{身長(cm)}^{0.725} \times 0.007184 \\ = \text{———m}^2$$

である。

計算例を以下に示す。

例) 体重 63.5 kg、身長 171 cm の男の場合の体表面積は

$$63.5^{0.425} \times 171^{0.725} \times 0.007184 = 1.744(\text{m}^2)$$

となる。

チアミンの 1 日当たり排泄量が 600 nmol / day とすると体表面積当たりの排泄量は

$$600 (\text{nmol}) / 1.744 (\text{m}^2) = 344 (\text{nmol} / \text{m}^2)$$

となる。

ビタミンごとに 1 日当たり尿中排泄量と体表面積当たり尿中排泄量の統計学的解析を行った。その結果、1 日当たりではビタミン B1 とビタミン C では有意な差が見られず、他のビタミンでは成人男女と幼児、あるいは成人女と幼児との間に有意な差が見られた。

体表面積当たりでは、有意な差がなかったのはビタミン B2、ナイアシン、ビタミン B12 およびビオチンであった。これらは 1 日当たりでは差が見られたが、体表面積当たりでは差が見られなくなり、体表面積比で算出する外挿方法が妥当であるのではないかと考えられた。

しかし、ビタミン B1、B6、パントテン酸、葉酸およびビタミン C では、成人男女、あるいは成人女と幼児との間に有意な差が見られた。つまり、これらのビタミンは体表面積当たりで算出する外挿方法は妥当ではないと考えられた。

このように、尿中排泄量を体表面積当たりで表すという手法で食事摂取基準の外挿方法の妥当性を検討した場合、その外挿方法はすべてのビタミンに対して当てはまるものではないことがわかった。妥当でなかったビタミンについては、今後、適当な外挿方法を検討する必要がある。

D. 健康危険情報

特記する情報は無い。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 口頭発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 引用文献

1. 日本人の食事摂取基準（2005 年版）（日本人の栄養所要量—食事摂取基準—策定検討会報告書）平成 16 年 10 月 厚生労働省
2. Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H and Hashizume N, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **51**, 319-328 (2005).
3. Kimura M, Fujita T and Itokawa Y. Liquid chromatographic determination of total thiamin content of blood. *Clin Chem* **28**, 29-31, (1982).
4. Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol. Chem.*, **258**, 5623-5628, (1983).
5. Shibata K, Ultramicro-determination of N^1 -methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)*, **61**, 599-604, (1987).
6. Shibata K, Kawada T and Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N^1 -methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N^1 -methyl-4-pyridone-3-carboxamide, by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **424**, 23-28, (1988).
7. Gregory JF and Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 879-883, (1979).
8. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M and Nakano Y. Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric. Food. Chem.*, **46**, 5177-5180, (1998).
9. Skeggs HR and Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol. Chem.*, **156**, 21-26, (1944).
10. Tamura T, Microbiological assay of folates. In *Folic Acid Metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol. 13 (Picciano MF, Stolstad ELR, and Gregory JF, III, eds) pp. 121-137, Wiley-Liss, New York, USA, 1990.
11. Fukui T, Iinura K, Oizumi J and Izumi Y Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci. Vitaminol*, **40**, 491-498, (1994).
12. Kishida K, Nishimoto Y, and Kojo S, Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **64**, 1505-1507 (1992).

表 1 . 幼児の尿中への水溶性ビタミン排泄量

(n = 28)	Mean	SD	Minimum	Maximum	Median
Thiamin (nmol / day)	436	257	67	1065	372
Riboflavin (nmol / day)	355	222	61	956	287
MNA+2-Py+4-Py (μ mol / day)	43	20	17	89	38
4-PIC (μ mol / day)	2.06	0.82	0.55	3.95	1.77
Cyanocobalamin (pmol / day)	54	43	10	180	39
Pantothenic acid (μ mol / day)	11.8	4.2	5.0	22.2	10.9
Folates (nmol / day)	16.70	3.92	7.80	27.19	16.22
Biotin (nmol / day)	31.5	18.5	5.7	82.2	28.1
Ascorbic acid (μ mol / day)	179	201	11	820	109

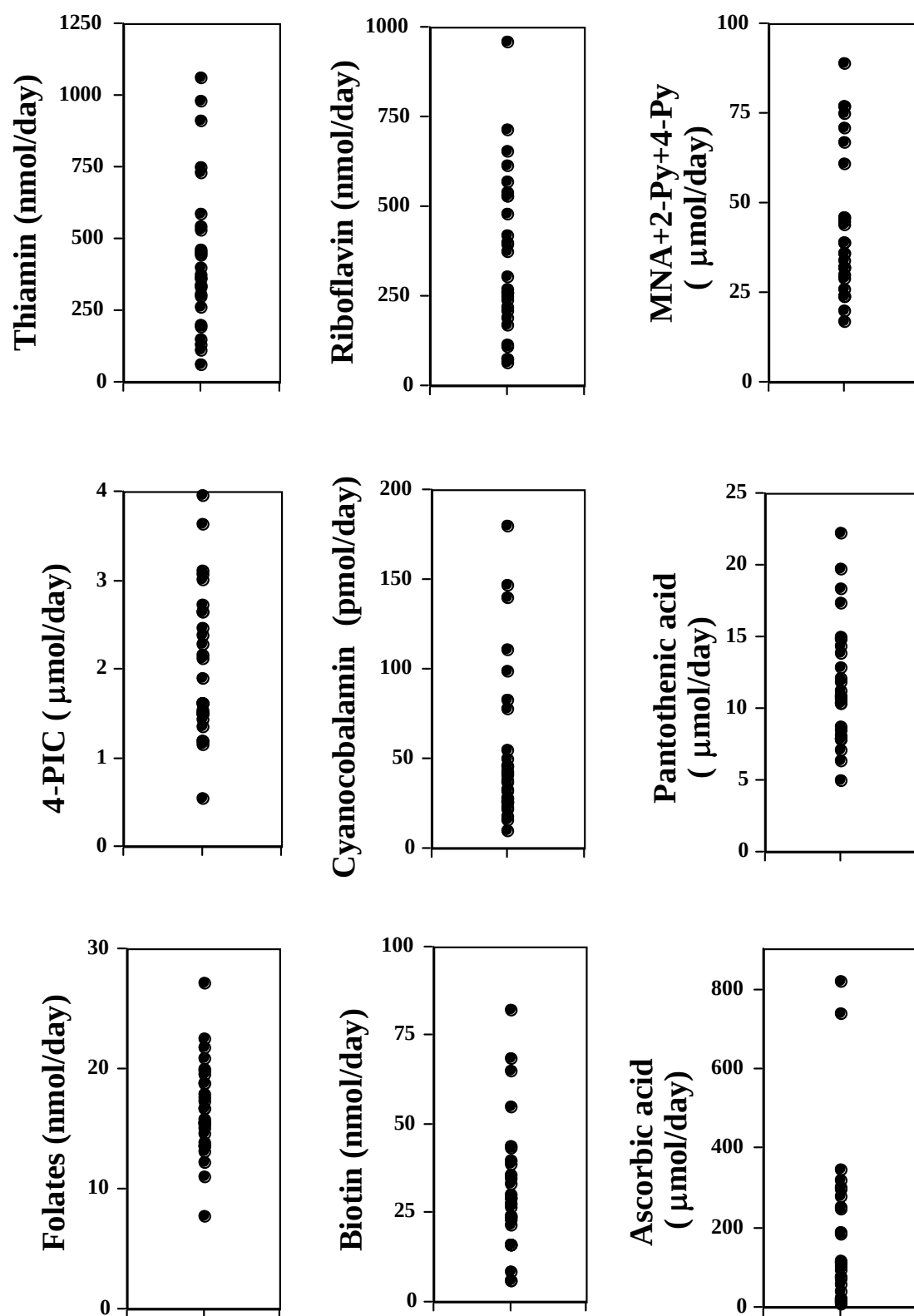


図 1. 幼児の 1 日尿中への水溶性ビタミン排泄量

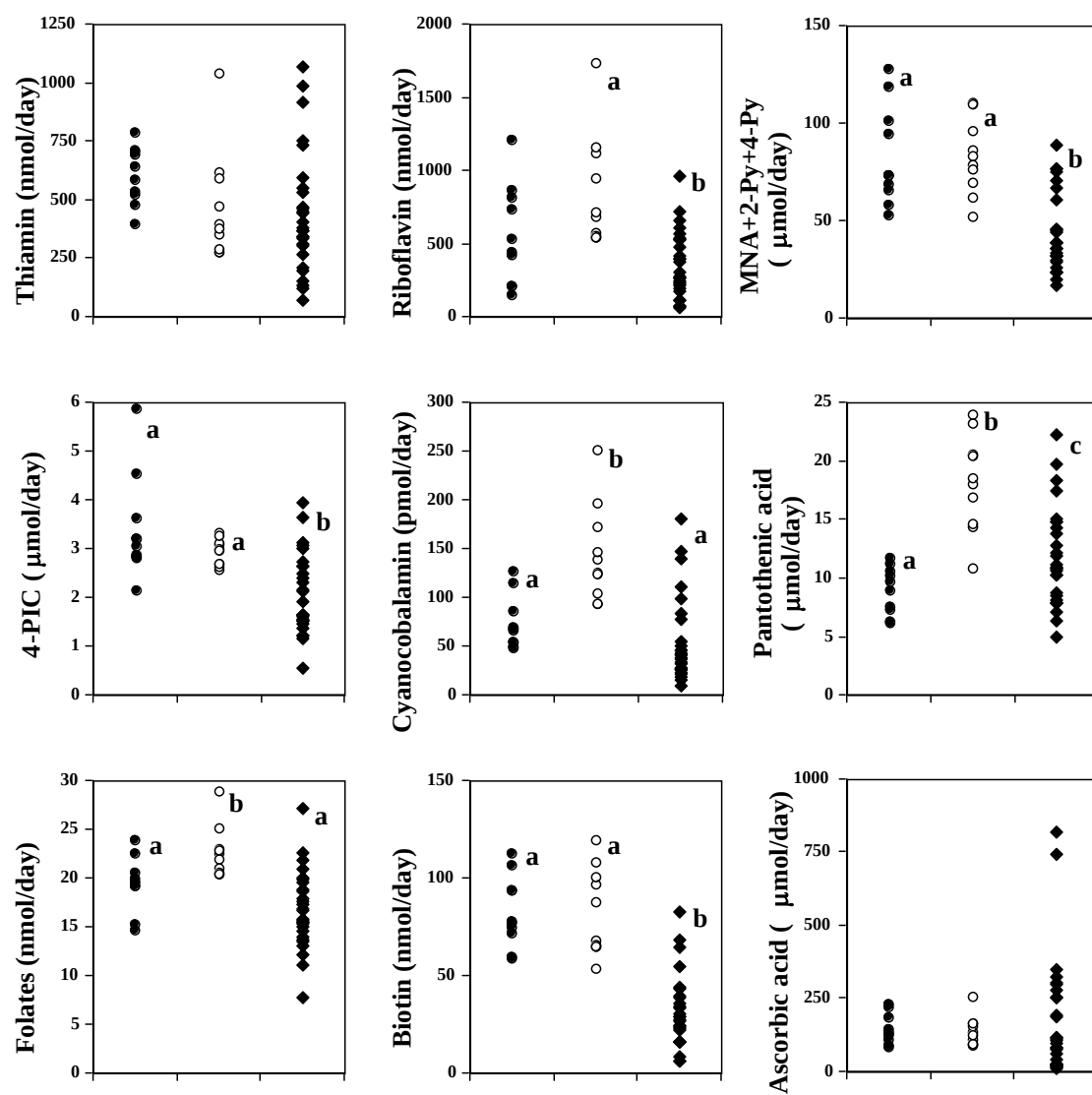


図 2. 成人と幼児の 1 日あたりの尿中排泄量

(● : 成人男, $n = 10$, ○ : 成人女, $n = 10$, ◆ : 幼児, $n = 28$. 異なるアルファベット間で $p < 0.05$ の有意差あり)

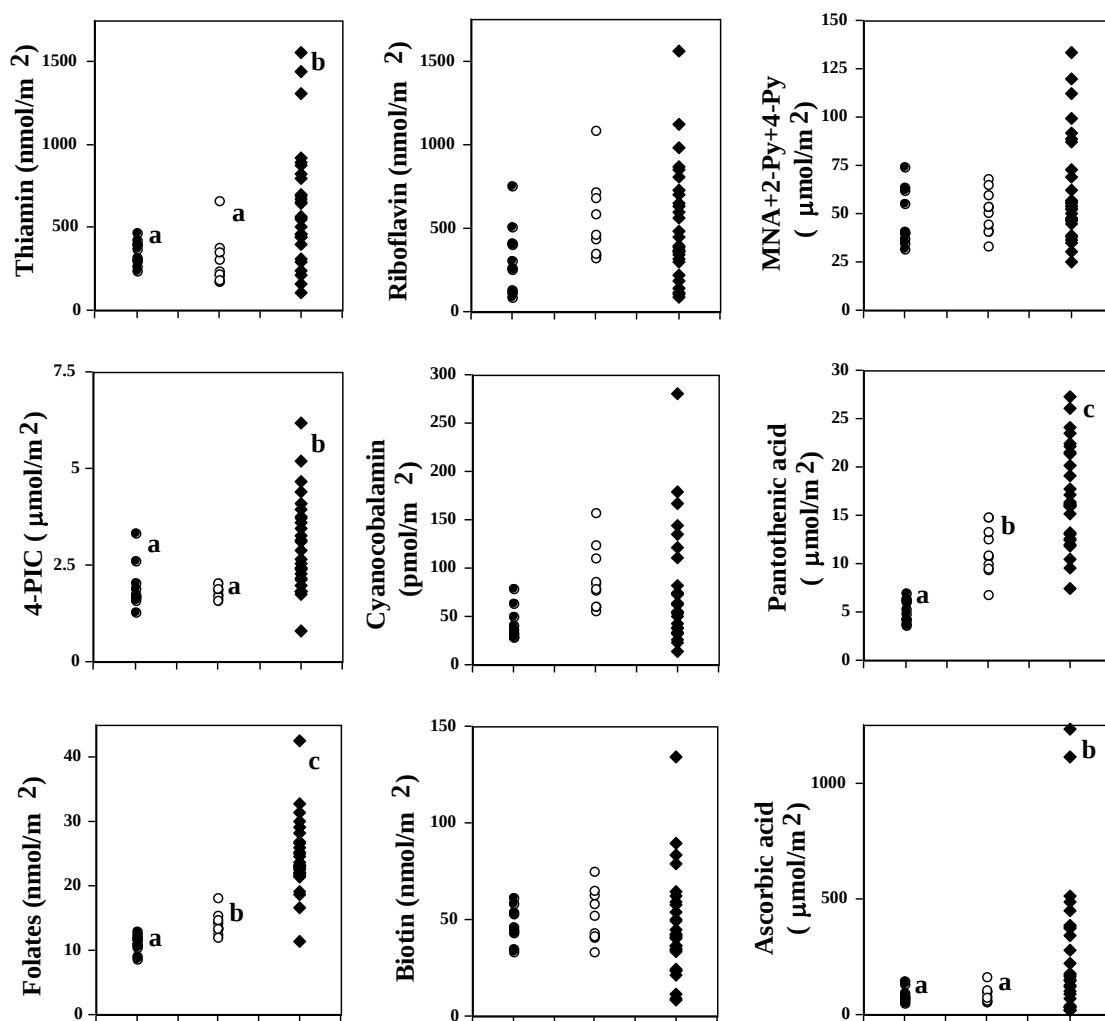


図3. 成人と幼児の体表面積当たりの尿中排泄量

(●：成人男，n = 10，○：成人女，n = 10，◆：幼児，n = 28. 異なるアルファベット間で $p < 0.05$ の有意差あり)